

اثر ژنوتوکسیک پراکسید هیدروژن بر اریتروسیت های مغز استخوان موش ماده کوچک آزمایشگاهی

دکتر جواد بهارآرا^{۱*}، دکتر فرهنگ حداد^{۲*}، دکتر محمدعلی شریعت زاده^{۳*}، تکتیم رضوی^۴

^{*}استادیار گروه زیست شناسی- دانشگاه آزاد اسلامی مشهد، ^{*}استادیار گروه زیست شناسی- دانشگاه فردوسی مشهد، ^{**}دانشیار گروه زیست شناسی- دانشگاه اراک، [†]کارشناس ارشد سلولی تکوینی- دانشگاه آزاد اسلامی مشهد.

تاریخ دریافت: ۸۷/۳/۵ تاریخ تایید: ۸۷/۶/۶

چکیده:

زمینه و هدف: پراکسید هیدروژن یکی از متداول ترین انواع پراکسیدانت ها می باشد که در محیط های آرایشگاهی زنانه و کارخانه های شیمیایی مواد شوینده به وفور مورد استفاده قرار می گیرد. اثرات ژنوتوکسیک این نوع مواد که تحت عنوان واکنش و تقابلات ژن و محیط نامیده می شود یکی از دغدغه های بهداشت و سلامت جهانی است. پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر پراکسید هیدروژن در ایجاد صدمات کروموزومی در اریتروسیت های مغز استخوان موش ماده نژاد Balb/C انجام شده است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی از ۶۳ سر موش ماده نژاد Balb/C به عنوان مدل آزمایشگاهی استفاده شد. موش های مذکور در گروه های کنترل، شاهد آزمایشگاهی و تجربی تقسیم شدند. موش های تجربی به مدت یک هفته، هر روز ۲ و یا ۳/۵ ساعت به طور استنشاقی تحت تیمار با پراکسید هیدروژن (H_2O_2) قرار گرفتند. پس از انجام تیمار موش های تجربی و شاهد آزمایشگاهی و کنترل تشریح و سلول های مغز استخوان آنها به کمک سرم جنینی گوساله خارج و بعد از گسترش، فیکسسیون و رنگ آمیزی، بوسیله میکروسکوپ نوری تعداد اریتروسیت های پلی کروماتیک دارای میکرونوکلئوس شمارش گردید. داده های کمی به دست آمده توسط آزمون t تحلیل گردید.

یافته ها: یافته های حاصل نشان داد میانگین تعداد اریتروسیت های پلی کروماتیک میکرونوکلئوس دار به ترتیب در گروه شاهد ۱ و تجربی ۱ (تیمار شده به مدت ۲ ساعت با پراکسید هیدروژن) $8/87 \pm 1/01$ و $35/75 \pm 3/05$ ($P < 0/05$)، و در گروه شاهد ۲ و تجربی ۲ (تیمار شده به مدت ۳/۵ ساعت با پراکسید هیدروژن) $8 \pm 2/36$ و $42/37 \pm 4/8$ ($P < 0/01$) بود. همچنین افزایش مدت زمان تیمار با پراکسید هیدروژن باعث افزایش میزان آسیب های کروموزومی می گردد ($P < 0/05$).

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این مطالعه بیان گر اثر ژنوتوکسیک پراکسید هیدروژن بر اریتروسیت های مغز استخوان موش ماده کوچک آزمایشگاهی می باشد.

واژه های کلیدی: اریتروسیت، پراکسید هیدروژن، ژنوتوکسیک، میکرونوکلئوس.

مقدمه:

محققین قرار گرفته و از دغدغه های بهداشت و سلامت جهانی شده است. اثرات آسیب رسان و ژنوتوکسیک برخی از این ترکیبات مورد مطالعه قرار گرفته است (۱، ۲، ۳). پراکسید هیدروژن یکی از انواع اکسیدانت ها است که در محیط های آرایشگاهی زنانه به مقدار زیاد مورد استفاده قرار می گیرد. این ترکیب یک واکنش دهنده شیمیایی و یک معرف اکسید کننده قوی است (۴، ۵). موجودات هوایی از

استفاده روزافزون از مواد شیمیایی گوناگون نظیر مواد آرایشی در محیط های آرایشگاهی و نیز کارخانه های شیمیایی مواد شوینده و نظایر آنها در جامعه مدرن امروزی واقعیتی غیرقابل انکار است. این مواد علاوه بر اثرات سوء بر کاربران آنها، بر اشخاصی نیز که در چنین محیط های کاری اشتغال دارند دارای اثرات نامطلوب بوده و در چند سال اخیر قانون توجه

(مانند پراکسید هیدروژن) در دوز ماکزیمم قابل تحمل سرطان زا می باشد (۱۵). با توجه به اینکه بسیاری از کاربران ترکیبات شیمیایی دارای پراکسید هیدروژن (نظیر محیط های آرایشگاهی زنانه) به صورت استنشاقی در معرض این مواد می باشند لیکن اثرات ژنوتوکسیک این مواد به روش استنشاقی تاکنون مورد مطالعه قرار نگرفته است. در پژوهش حاضر اثر پراکسید هیدروژن بر ایتروسیست های مغز استخوان (با توجه به شدت تقسیم سلولی و حساسیت بالای این سلول ها به عوامل آسیب رسان محیطی) موش ماده کوچک آزمایشگاهی به روش کاربری استنشاقی بررسی شده است.

روش بررسی:

این تحقیق از نوع تجربی آزمایشگاهی است و در طی سال های ۱۳۸۷-۱۳۸۶ در آزمایشگاه تحقیقاتی سلولی تکوینی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد انجام شده است. در این پژوهش از موش ماده بالغ نژاد Balb/C به عنوان مدل آزمایشگاهی استفاده شد. حیوانات مورد نیاز از موسسه سرم سازی رازی مشهد تهیه و در اتاق پرورش حیوانات تکثیر و در درجه حرارت 23 ± 1 ، رطوبت ۷۰-۶۰ درصد و دوره نوری طبیعی (۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی) در قفس های ویژه ای که هر هفته دوبار شستشو و ضد عفونی می شدند، نگهداری و برای تغذیه آنها از غذای آماده استاندارد (تهیه شده از شرکت جوانه خراسان مشهد) استفاده گردید. آب کافی توسط بطری شیشه ای در اختیار آنها قرار داده شد. در این مطالعه برای اطمینان از بلوغ موش ها از حیوانات ۲/۵ تا ۳ ماهه با وزن حدود ۲۸-۲۴ گرم استفاده شد. تعداد ۶۳ موش بالغ ماده به طور تصادفی در گروه های زیر تقسم شدند:

گروه کنترل: موش های این گروه به تعداد ۱۲ سر در اتاق پرورش حیوانات و در شرایط طبیعی نگهداری شدند. گروه شاهد آزمایشگاهی: موش های این گروه به تعداد ۱۲ سر به مدت یک هفته هر روز ۲ ساعت در شرایط آزمایشگاهی بدون پراکسید هیدروژن قرار داده شدند.

طریق اکسیداسیون کامل مولکول های غذایی اکسیژن را برای تولید انرژی مورد استفاده قرار می دهند اما احیای ناکامل اکسیژن مولکول های بسیار فعالی مانند رادیکال سوپر اکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل تولید می کند. این رادیکال ها به سرعت ترکیبات سلولی را اکسید می کنند و به شدت به سلول ها آسیب می رسانند (۶). Rivlin نشان داده است که غلظت های پایین پراکسید هیدروژن برای ظرفیت گیری اسپرم (Capacitation) مفید است اما غلظت های بالا این فرایند را مهار می کند (۷). برخی مطالعات نیز بیان گر آن است که استفاده غلظت های بالای پراکسید هیدروژن از طریق شوینده های دهانی باعث انفارکتوس یا انسداد رگی- مغزی می شود (۹،۸). در بدن جانوران سیستم خاصی برای مقابله با آسیب های حاصل از رادیکال های آزاد وجود دارد که به نام سیستم دفاع آنتی اکسیدانی معروف است، هنگامی که عدم تعادل در میزان تولید رادیکال های آزاد و سیستم دفاع آنتی اکسیدانی بوجود آید این حالت را استرس اکسیداتیو گویند (۱). تعدادی از مطالعات نشان داده است، پراکسید هیدروژن باعث القای استرس اکسیداتیو شده و این استرس منجر به نقص در فعالیت سلول های آندوتلیال و آسیب سلولی می گردد و در نهایت بیماری های نظیر تصلب شرایین و سایر بیماری های قلبی عروقی ایجاد می شود (۱۰، ۱۱، ۱۲). پوست یکی از بافت های اصلی هدف پراکسید هیدروژن است و مطالعات انجام شده توسط Klein-Szanto نشان داده است که پراکسید هیدروژن منجر به اپیدرمولیز پیشرفته و هیپرپلازی اپیدرمال می شود. این مطالعه همچنین پیشنهاد کرده است که پراکسید هیدروژن یک پروموتور بسیار ضعیف تومور پستی است (۱۳). Regnier نیز اثر پراکسید هیدروژن را در موش از طریق تزریق صفاقی بررسی و نتایج وی نشان داده است پراکسید هیدروژن باعث افزایش معنی دار تعداد سلول های میکرونوکلئوس دار در مغز استخوان می شود (۱۴). همچنین Nohynek گزارش نموده است که برخی از اجزای ترکیبات رنگ موها

گروه شاهد آزمایشگاهی ۲: موش های این گروه به تعداد ۱۲ سر به مدت یک هفته هر روز ۳/۵ ساعت در شرایط آزمایشگاهی بدون پراکسید هیدروژن قرار داده شدند.

گروه تجربی ۱: موش های این گروه به تعداد ۱۲ سر به مدت یک هفته هر روز ۲ ساعت به طور استنشاقی در معرض پراکسید هیدروژن قرار داده شدند.

گروه تجربی ۲: موش های این گروه به تعداد ۱۵ سر به مدت یک هفته هر روز ۳/۵ ساعت به طور استنشاقی در معرض پراکسید هیدروژن قرار داده شدند.

ماده شیمیایی استفاده شده در این مطالعه اکسیدانت ۹ درصد اتوسا^۱ محصول کشور ایران بود. ترکیب اصلی این ماده پراکسید هیدروژن بوده و برای بیرنگ کردن موها در سالن های آرایشگاهی زنانه مورد استفاده فراوان قرار می گیرد. یک تیوب از این ماده (۶۰ میلی گرم) را در داخل بوکالی با مساحت ۱۸/۷۵ سانتی متر و حجم ۱۰۳/۱۲۵ سانتی متر مکعب ریخته و سر آن را با توری پوشانیدیم. سپس آن را در قفس مخصوص موش ها که تنها دارای یک سوراخ برای تهویه بود قرار دادیم. در هر مرحله تعداد ۳ یا ۴ موش را در قفس جای دادیم. پراکسید هیدروژن داخل بوکال، در تمام فضای ظرف پخش شده و موش های تجربی به مدت یک هفته هر روز ۲ یا ۳/۵ ساعت از هوای داخل قفس مذکور استنشاق نمودند. برای بررسی اثرات ژنوتوکسیک احتمالی از تست میکرونوکلئوس ارایه شده توسط Schmid به عنوان یک روش بررسی رایج و قابل اعتماد استفاده گردید (۱۶). مطالعات توکسیکولوژی متعددی استفاده از این روش بررسی را پیشنهاد می کنند (۱۷-۲۲). برای این منظور پس از انجام تیمار حیوانات، کلیه موش های گروه های تجربی و شاهد آزمایشگاهی و کنترل مربوط بوسیله کلروفرم کشته (مجریان در کلیه مراحل پژوهش پایبند موازین اخلاقی کار با حیوان بودند) و سپس به کمک وسایل جراحی، پوست و ماهیچه های اطراف استخوان ران را کنار زده و دو استخوان ران را بطور کامل خارج نموده و پس از

تمیز کردن کامل استخوان، دو سر آن را سوراخ کرده و بوسیله سرنگ حاوی ۲cc محلول سرم جنینی گاوی (Gibco) مغز استخوان تخلیه گردید. مغز استخوان خارج شده بوسیله دستگاه سانتریفوژ (Kokusan, Japan) به مدت ۱۰ دقیقه با ۹۰۰ rpm سانتریفوژ شد. سپس مایع فوقانی لوله سانتریفوژ را دور ریخته و با پی پت پاستور مکنده یک قطره از محلول باقیمانده را بر روی لام قرار داده و گسترش تهیه و با متانول (Merk, Germany) تثبیت و برای رنگ آمیزی از رنگ مای گرانوالد (Merk, Germany) و گیمسا (روز آمون- ایران) استفاده شد. پس از انجام رنگ آمیزی تعداد اریتروسیت های پلی کروماتیک میکرونوکلئوس دار شمارش گردید. برای شمارش سلول ها از میکروسکوپ نوری (Nikon, Japan) استفاده شد بدین ترتیب که برای هر نمونه استخوان ران تعداد ۱۰۰۰ سلول شمارش و در این هزار سلول تعداد سلول های دارای میکرونوکلئوس تعیین گردید. داده های کمی حاصل به کمک آزمون t در سطح معنی داری $P < 0.05$ تجزیه و تحلیل گردید.

یافته ها:

تجزیه و تحلیل آماری نتایج شمارش میانگین تعداد اریتروسیت های پلی کروماتیک دارای میکرونوکلئوس مغز استخوان موش های ماده کنترل ($7/58 \pm 0/802$) در مقایسه با موش های شاهد آزمایشگاهی ۱ ($8/87 \pm 1/013$) و شاهد آزمایشگاهی ۲ ($8 \pm 2/36$) تغییر معنی دار نشان نداد ($P > 0.05$). تجزیه و تحلیل آماری میانگین تعداد اریتروسیت های پلی کروماتیک میکرونوکلئوس دار مغز استخوان در موش های ماده تیمار شده به مدت ۲ ساعت با پراکسید هیدروژن ($35/75 \pm 3/055$) در مقایسه با گروه شاهد آزمایشگاهی ۱ ($8/87 \pm 1/013$) افزایش معنی دار نشان داد ($P < 0.05$). همچنین تجزیه و تحلیل آماری میانگین تعداد اریتروسیت های پلی کروماتیک میکرونوکلئوس دار مغز استخوان در موش های ماده تیمار شده به مدت ۳/۵ ساعت با پراکسید هیدروژن

(۴۲/۳۷±۴/۸۰) در مقایسه با گروه شاهد آزمایشگاهی ۲ (۸/۰۰±۲/۳۶) افزایش معنی دار نشان داد ($P<0/01$).

همچنین تفاوت میانگین تعداد اریتروسیت های پلی کروماتیک میکرونوکلئوس در گروه تجربی ۱ و ۲ معنی دار بود ($P<0/05$) که نشان می دهد افزایش مدت زمان تیمار با پرواکسید هیدروژن باعث افزایش میزان آسیب های کروموزومی می گردد.

بحث:

در مطالعه حاضر اثر ژنوتوکسیک پراکسید هیدروژن بر اریتروسیت های پلی کروماتیک مغز استخوان موش ماده کوچک آزمایشگاهی از طریق ارزیابی تست میکرونوکلئوس بررسی شده است. یافته های حاصل نشان داد، استفاده استنشاقی H_2O_2 (۹ درصد) باعث افزایش فراوانی اریتروسیت های پلی کروماتیک میکرونوکلئوس دار در گروه های تجربی نسبت به شاهد می گردد. همچنین افزایش مدت زمان تیمار با پراکسید هیدروژن باعث افزایش میزان آسیب های کروموزومی می گردد. مطالعات قبلی نشان داده است که ملکول های نظیر رادیکال سوپر اکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل به سرعت ترکیبات سلولی را اکسید نموده و به سلول ها آسیب می رساند و اگر این آسیب ترمیم و جبران نشود منجر به بیماری های نظیر سرطان، دیابت، تصلب شرایین و پیری زود رس می گردد (۶). رادیکال آزاد ماده ای است که می تواند به طور مستقل وجود داشته باشد (واژه آزاد به همین علت اطلاق می شود) و دارای حداقل یک الکترون جفت نشده بوده (۱) و در بدن موجودات بسیار واکنش پذیر است و آسیب های زیادی را به ماکرومولکول های نظیر پروتئین ها، لیپیدها، قندها و DNA وارد می سازد (۲۳). برخی از پژوهش های قبلی انجام شده با نتایج حاصل سازگاری دارد که از جمله می توان به تجربیات Regnier اشاره نمود این محقق با بررسی اثرات پراکسید هیدروژن بصورت تزریق صفاقی به موش نشان داده

است که تعداد اریتروسیت های پلی کروماتیک میکرونوکلئوس دار مغز استخوان افزایش معنی دار می یابد (۱۴). همچنین تجربیات انجام شده نشان داده است که برخی مواد ترکیبی با رنگ موها (نظیر پراکسید هیدروژن) باعث سرطان زایی می شود (۱۵). برخی مطالعات نیز نشان داده است که پراکسید هیدروژن منجر به موتاسیون هیپوگزانتین گوانین فسفوریبوزیل ترانسفراز در لنفوسیت های T می شود (۲۴، ۲۵). به هر حال به نظر می رسد پاسخ سلول ها به پراکسید هیدروژن متفاوت بوده و فاکتور های تاثیر گذار در این امر می تواند غلظت کاتالاز، توانایی تعمیر DNA، مقدار تشکیل رادیکال های هیدروکسیل و هم چنین روش بکار برده شده باشد (۲۶). نتایج حاصل از برخی تجربیات دیگر با نتایج ما سازگاری ندارد که از جمله می توان به تجربیات Fenech اشاره نمود. وی با استفاده از روش تست میکرونوکلئوس ژنوتوکسیسته پراکسید هیدروژن را در لنفوسیت های کشت شده انسانی مورد ارزیابی قرار داده است نتایج وی بیان گر آن است که پراکسید هیدروژن بطور عمده باعث القا نکروز می گردد و القا میکرونوکلئوس معنی دار نیست (۲۷). همچنین Munro با بررسی ارتباط شوینده های دهانی حاوی پراکسید هیدروژن با سرطان دهان گزارش نموده است که به نظر نمی رسد پراکسید هیدروژن تاثیر ژنوتوکسیک برای انسان داشته باشد (۲۸). مطالعات Hueber-Becker در مورد تاثیر رنگ های اکسیداتیو نیز بیان گر آن است که استعمال این ترکیبات توسط افراد، فشار سیستمیک اندکی ایجاد می کند و احتمالاً آسیب چندانی برای انسان ندارد (۲۹). به نظر می رسد این تناقض بین نتایج تحقیق حاضر با برخی تجربیات قبلی فوق الذکر بطور عمده به علت تفاوت شرایط مطالعه (in vivo, in vitro) می باشد به گونه ای که در مطالعات in vitro اثرات پراکسید هیدروژن در القای میکرونوکلئوس معنی دار نبوده در حالی که تحت شرایط in vivo این اثرات معنی دار است.

نتیجه گیری:

نتایج حاصل از این مطالعه بیان گر اثرات ژنوتوکسیک پراکسید هیدروژن استنشاقی بر اریتروسیت های مغز استخوان موش ماده کوچک آزمایشگاهی می باشد و همچنین افزایش مدت در معرض قرار گیری باعث افزایش اثرات ژنوتوکسیک آن می شود. لذا پیشنهاد می گردد افرادی نظیر آرایشگران خانم و کارگران کارخانه های تولید مواد شیمیایی همچون شوینده ها که در محیط های حاوی بخارات این ترکیبات اشتغال دارند حتماً تدابیر لازم نظیر استفاده از

ماسک های دهانی و تهویه مطبوع برای کم کردن غلظت پراکسید هیدروژن و نیز جلوگیری از اثرات ژنوتوکسیک احتمالی آن بعمل آورند.

تشکر و قدردانی:

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد و مدیر محترم گروه زیست شناسی و همکاران محترم آزمایشگاه تحقیقاتی تکوین جانوری گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی مشهد تقدیر و تشکر می شود.

منابع:

- 1.Shariatzadeh MA, Malekirad A, Fani A, Dezfulian A. Free radicals and antioxidaion impact on health and disease. Iege Publication. 2007; 214-45.
- 2.Weiss A, Delproposto J, Giroux CN. High-through put phenotypic profiling of gene-environment interactions by quantitative growth curve analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Anal Biochem*. 2004 Apr; 327(1): 23-34.
- 3.Hung RJ, Boffetta P, Brennan P, Malaveille C, Gelatti U, Placidi D, et al. Genetic polymorphisms of MPO, COMT, MnSOD, NQO1, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk. *Carcinogenesis*. 2004 Jun; 25(6): 973-8.
- 4.Kapuse AP, Hydrogen peroxide: a messenger in important in cancer survival. *Niehs*. 2003; 300(5619): 650-3.
- 5.DeSesso JM, Lavin AL, Hsia SM, Mavis RD. Assessment of the carcinogenicity associated with oral exposures to hydrogen peroxide. *Food Chem Toxicol*. 2000 Nov; 38(11): 1021-41.
- 6.Floyd RA. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J*. 1990 Jun; 4(9): 2587-97.
- 7.Rivlin J, Mendel J, Rubinstein S, Etkovitz N, Breitbart H. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod*. 2004 Feb; 70(2): 518-22.
- 8.Watt BE, Proud foot AT, Vale JA. Hydrogen peroxide poisoning. *Toxicol Rev*. 2004; 23(1): 51-7.
- 9.Petrozzi L, Lucetti C, Scarpato R, Gambaccini G, Trippi F, Bernardini S, et al. Cytogenetic alterations in lymphocytes of Alzheimer's disease and Parkinson's disease patients. *Neurol Sci*. 2002 Sep; 23(Supple 2): S97-8.
- 10.Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 2003 Feb; 91(3A): 7A-11A.
- 11.Jaimes EA, Sweeney C, Raij L. Effects of the reactive oxygen species hydrogen peroxide and hypochlorite on endothelial nitric oxide production. *Hypertension*. 2001 Oct; 38(4): 877-83.
- 12.Ballinger SW, Patterson C, Yan CN, Doan R, Burow DL, Young CG, et al. Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circ Res*. 2000 May; 86(9): 960-6.

13. Klein-Szanto AJ, Slaga TJ. Effects of peroxides on rodent skin: epidermal hyperplasia and tumor promotion. *J Invest Dermatol*. 1982 Jul; 79(1): 30-4.
14. Regnier JF, Molinier B, Bently KS, Gerlache DE. Micronucleus tests in mice with hydrogen peroxide. *Fundam Appl Toxicol*. 1996; 30(1): 233.
15. Nohynek GJ, Fautz R, Benech-Kieffer F, Toutain H. Toxicity and human health risk of hair dyes. *Food Chem Toxicol*. 2004 Apr; 42(4): 517-43.
16. Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res*. 1975 Feb; 31(1): 9-15.
17. Hayashi M, Tice RR, MacGregor JT, Anderson D, Blakey DH, Kirsh-Volders M, et al. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat Res*. 1994 Jun; 312(3): 293-304.
18. Hosseinimehr SJ, Tavakoli H, Pourheidari G, Sobhani A, Shafiee A. Radioprotective effects of citrus extract against gamma-irradiation in mouse bone marrow cells. *J Radiat Res (Tokyo)*. 2003 Sep; 44(3): 237-41.
19. Sivikova K, Dianovsky J, Piesova E, Holeckova B. Chromosomal changes induced in mouse bone marrow cells following six weeks inhalation of cyclohexanol. *Acta Biol Hung*. 2007; 58(4): 389-96.
20. Tiku AB, Abraham SK, Kale RK. Protective effect of the cruciferous vegetable mustard leaf (*Brassica campestris*) against in vivo chromosomal damage and oxidative stress induced by gamma-radiation and genotoxic chemicals. *Environ Mol Mutagen*. 2008 Jun; 49(5): 335-42.
21. Kirsch-Volders M, Fenech M. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis*. 2001 Jan; 16(1): 51-8.
22. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environ Health Perspect*. 1993 Oct; 101 Suppl 3: 101-7.
23. SSCP, European Commission Scientific Committee on Consumer products. A summary of the opinion on hydrogen peroxide in tooth whitening products. 2005; 22-4.
24. IRAC. (International Research Association on Cancer). Monograph on the evaluation of carcinogenic risk chemical to human hydrogen peroxide, 1999; 249-70.
25. Liera SD, Podlutzky AM, Hour SM, Lambert B. Hydrogen peroxide induced mitigation at HPRT locus in primary human T lymphocytes. *Mutant Res*. 2000; 496(1): 51-61.
26. Naik S, Tredwin JC. Hydrogen peroxide tooth whitening (bleaching): review of in relation to possible carcinogenesis. *Oral oncology*. 2005; 42(7): 668-74.
27. Fenech M, Crott J, Turner J, Brown S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis*. 1999 Nov; 14(6): 605-12.
28. Munro IC, Williams GM, Heymann HO, Kroes R. Use of hydrogen peroxide-based tooth whitening products and its relationship to oral cancer. *J Esthet Restor Dent*. 2006; 18(3): 119-25.
29. Hueber-Becker F, Nohynek GJ, Meuling WJ, Benech-Kieffer F, Toutain H. Human systemic exposure to a [¹⁴C]-para-phenylenediamine-containing oxidative hair dye and correlation with in vitro percutaneous absorption in human or pig skin. *Food Chem Toxicol*. 2004 Aug; 42(8): 1227-36.